

## Bacillus thuringiensis 내독소단백질이 미국환불나방 조직의 단백질 합성에 미치는 영향

전 향 미 · 강 석 권\* · 서 숙 재

경상대학교 자연과학대학, \*서울대학교 농업생명과학대학

### The Effect of $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the Protein Synthesis of the Several Tissues of *Hyphantria cunea* Drury

Cheon Hyang Mi, Seok Kwon Kang\*, and Sook Jae Seo

College of Natural Sciences, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

\*College of Agricultural and life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea

#### Abstract

The toxic effect of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin was determined in the midgut, fat body and Malpighian tubules from larvae of *Hyphantria cunea* using the autoradiography and Western blot methods. Bt  $\delta$ -endotoxin crystals inhibited protein synthesis and elongation factor-2 activity of all tissues tested.

**Key word :** *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki*,  $\delta$ -endotoxin, protein synthesis, elongation factor-2(EF-2), *Hyphantria cunea*

#### 서 론

*Bacillus thuringiensis*는 그람양성의 토양세균으로 포자형성기 동안 강력한 살충효과를 가진 내독소 결정체 단백질을 생성하는데, 이 내독소단백질은 숙주의 특이성에 따라서 나비목, 파리목 및 딱정벌레목에 대하여 각각의 치사 선택성을 나타낸다.

*Bt* 독소의 일반적인 살충기작은 일단 해충이 독소를 섭식하게 되면 수 분내에 protoxin에 의한 장(gut)과 구기(mouth part)의 마비가 일어나 섭식이 중단된다. 중장의 소화액에 의한 활성화된 독소는 중장피막세포의 미세포융모를 탈락시키며 소포체(Lello *et al.*, 1984; Endo & Nishiitutsuji, 1980; Luthy & Ebersold, 1981), 미토콘드리아(Ebersold *et al.*, 1977; Ellar, 1990; Perey, 1983), 이온채널(Angus, 1968; Griego *et al.*, 1979) 등의 변화도 초래한다. 아울러, 포도당수송(Fast & Donaghue, 1971), 산소흡

수계(Chance & Williams, 1955; Faust *et al.*, 1974)의 붕괴로 인한 ATP의 손실을 가져온다. 이렇게 되면 중상 세포는 기저막으로부터 분리되고 파괴되어 혈액내 이온과 pH의 급격한 변화로 인한 세포융해(Cell lysis)로 치사하게 된다(Cooksey, 1971). 이와같이 *Bt* 독소의 곤충장내 유입과정과 섭식한 곤충이 치사하는 기작에 관한 광범위한 연구가 병행되어 왔으나 해충 방제에 대한 *Bt*의 사용이 제한되는데 부분적인 문제점으로 *Bt*의 종에 대한 선택성때문이며 또 한편으로는 섭식에 의해서만 독소가 활성화되기 때문에 효율성이 떨어진다는 점이다(Wolfersberger, 1990; Yunovitz & Yawetz, 1988). 이러한 두가지 문제점을 향상시키기 위해 많은 연구들이 진행되고 있지만 커다란 성과를 거두지 못하고 있다. 그 이유로는 내독소의 선택성에 대한 생리, 생화학적 기초와 내독소의 살충작용을 규명하기 위한 연구가 불충분하기 때문이다.

앞서 보고한 연구에서 *kurstaki* 내독소단백질의 독성에 의한 세포내소기관의 형태적 변화를 확인한 바 있어, 본 연구에서는 특히 소포체의 구형화로 인한 단백질합성의 정지 등 생화학적 변화와 치사 이전의 생리적 변화를 autoradiography와 Western blot으로 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 균주 및 배지

실험에 사용한 균주는 미 농무성 Faust박사로부터 분양받은 *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1이었고, 배양을 위한 배지는 G.Y.S(Glucose Yeast extract Salt)배지를 사용하였다.

### 2. 실험곤충사육

미국흰불나방(*H. Cunea* D.)을  $26^{\circ}\text{C} \pm 1$ , L/D=16:8, RH  $75 \pm 5\%$ 에서 인공사료로 사육하면서 6령에서 7령으로 탈피한 종령 유충을 12시간 굶긴 후 사용하였다.

### 3. Bt. var. *kurstaki* HD-1의 돒소 분리

*Bt. var. krustaki* HD-1의 돒소를 생산하기 위하여 G.Y.S배지에서  $30^{\circ}\text{C}$ , 140rpm으로 7-8시간 배양한 후 대수증식기(exponential phase)에 있는 균을 1l의 G.Y.S배지에 6%를 접종하여  $30^{\circ}\text{C}$ , 300rpm으로 3-4일간 진방배양하였다(Thomas & Ellar, 1993).

위상차현미경으로 배양한 균들의 자가용해(auto-lysis)를 확인한 후, 7,000g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 수집하였다. 0.0% Triton X-100을 포함한 1M NaCl용액으로 침전물을 3회 세척하여 초음파분쇄기(Ultrasonicator)를 이용하여 22,000 cycle/sec의 속도로 30초 동안 균질화(homogenize)한 후 sucrose 67%, 72%, 78%, 87%의 불연속 밀도구빵을 만들어 초고속 원심분리를 이용하여 25,000rpm으로 16시간 원심분리하였다. 원심분리 후에 결정성독소만을 채취하여 중류수로 3회 이상 10,000rpm에 20분씩 원심분리로 씻은 후 냉동건조시켰다.

### 4. 돒소 투여

미국흰불나방(*H. cunea* D.) 종령 유충을 12시간 굶긴 후 돒소가 혼합된 인공사료(100 $\mu\text{g}/\text{g}$ )를 섭식시

켰다. 2시간 동안 섭식여부를 관찰한 다음  $27^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간동안 방치한 후 살아있는 유충을 선택하여 각 조직을 적출하여 시료로 사용하였다. 즉, Endo 와 Nishiitsutsuji-Uwo(1980)의 병리학적 증상에 따른 일련의 단계(단계 0, 행동과 외형은 정상이나 섭식을 중단; 단계 1, 다소 활기가 없음; 단계 2, 극도로 움직임이 둔함; 단계 3, 완전히 마비를 일으킨 상태.) 중 단계 0과 단계 1에 해당하는 것이다.

### 5. SDS-gel 전기영동

Laemmli(1971)의 방법을 이용하여 1% SDS를 혼합한 12.5% polyacrylamide gel을 사용하였고 150V에서 45분동안 전기영동하여 Coomassie blue staining하였다. [ $\text{S}^{35}$ ]-methionine으로 표지시킨 시료는 전기 영동후 건조시킨 다음 암실에서 X-ray film을 덮어 intensify cassette에 넣은 후  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 감광시켰다.

### 6. Autoradiography

지방체와 중장, 말피기씨관을 적출하여 돒소를 함유한 Garce's medium(50 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ )에 넣은 후 2시간 배양하였다. 배양한 후 250 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  비율로 [ $\text{S}^{35}$ ]-methionine을 넣어 2시간 동안 방사능표지(radiolabelling)시킨 후, Ringer's solution로 세척하였다. Fat body homogenization buffer(FBHB, 50mM Tris-HCl, pH 8 containing 1mM PMSF, 1mM dithiothreitol, 1mM EDTA, 0.01%[w/v] 1-phenyl 2-thiourea)에서 초음파분쇄기(ultrasonicator)로 균질화하고, 12,000g에서 원심분리하여 상층액을 단백질 영동시료로 사용하였다.

### 7. Western blot

지방체, 중장, 말피기씨관 등을 적출한 후 단백질 분획을 얻은 다음 동일량을 전기영동하여 nitrocellulose membrane에 전기전이(electrotransfer) 시켰다. 이nitrocellulose membrane을 blocking solution (5% skim milk-TBS)에서 1시간 진탕하면서 정온반응시킨 후, 1:200으로 회색한 EF-2 1차 항체에서 2시간 정온반응시킨 다음, 다시 Tris buffered saline (TBS; 0.2M Tris, 0.5M NaCl, pH 7.5)-용액에서 10분씩 3회 세척하였다. 2차 항체인 rabbit IgG-HRP conjugate solution(Bio-Rad. Co.)에서 1시간 반응시

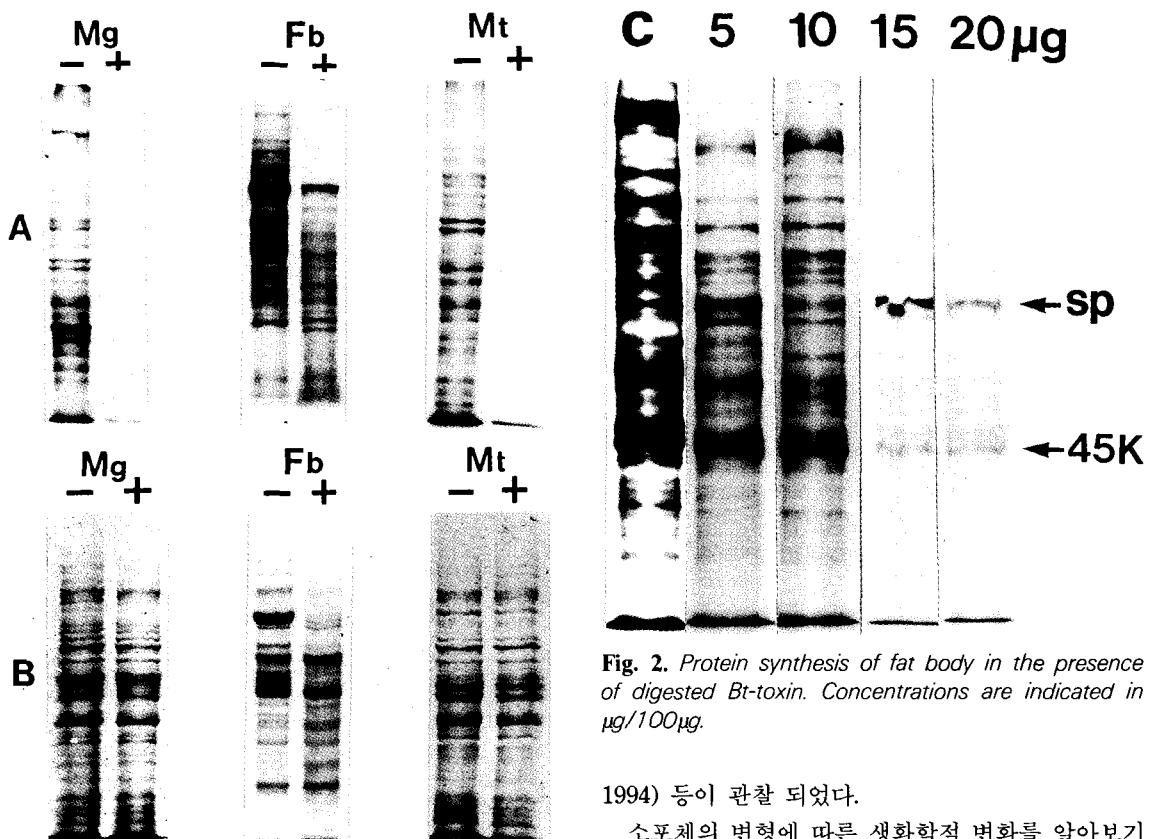


Fig. 1. Comparison of protein synthesis by the midgut (Mg), fat body (Fb), and Malpighian tubule (Mt) between control(−) and Bt toxin ingested larvae(+). A. Autoradiograph; B. Coomassie blue staining.

친 후 TBS 용액에서 다시 15분씩 3회 세척하였다. 암실에서 membrane을 ECL 용액(Amersham Co.)에 수 초 동안 담근 후 X-ray film에 노출시켜 현상 후 번역여장인자-2의 밴드를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

*Bt*를 섭식한 유충이 나타내는 병리적 증후에 따라 Endo 등(1980)은 0-3단계로 구분하였다. 본 실험의 시료로 사용된 흰불나방의 유충은 독소 섭식 후 대부분은 단계 0-1사이에 속하여 섭식을 중단하고 움직이지 않는 증후를 나타내었다. 해부결과 지방체, 말피기씨관, 중장 조직들이 육안으로는 병변이 없는것처럼 신선한 상태로 관찰되었다. 그러나 동일한 시료를 전자현미경으로 관찰한 결과 이미 세포내소기관의 심각한 변형과 표면구조의 손상(Cheon et al.,

1994) 등이 관찰 되었다.

소포체의 변형에 따른 생화학적 변화를 알아보기 위하여 단백질합성과 번역 연장인자-2의 활성을 조사하였다. 흰불나방유충에 *Bt* 독소를 섭식시키고 12시간 경과후, 중장, 말피기씨관을 적출하여  $^{35}\text{S}$ -methionine이 함유된 Grace's medium에 2시간 배양한 결과 섭식유충의 중장과 말피기씨관은 단백질 합성이 거의 이루어지지 않았으며 지방체의 경우는 약50% 이상의 단백질합성이 저해현상을 나타내었다(그림 1).

또한 *in vitro*상태에서 정상적인 지방체를 적출하여 *Bt* 독소를 농도별로 처리하여  $^{35}\text{S}$ -methionine을 넣고 단백질합성능을 실험한 결과는 5µg/100µl의 농도에서부터 단백질합성이 서서히 저하되기 시작하다가 15µg/µl 이상의 농도에서 단백질합성이 거의 90% 이상 저하됨을 볼 수 있었다(그림 2). 그러나 이러한 고농도의 독소처리에도 불구하고 2가지의 단백질은 지속적으로 합성되었는데, 한가지 45 Kd 단백질이었으며 다른 한가지는 immunoprecipitation으로 확인 결과 80 Kd 저장단백질-1임이 판명되었다.

Endo와 Nishiutsuji-Uwo(1980)는 나비목에 속하는 *pieris*, *Lymantria* 그리고 *Ephestria* 3종에 *Bt* var. *isrealensis*를 처리하여 이 곤충들의 중장세포에

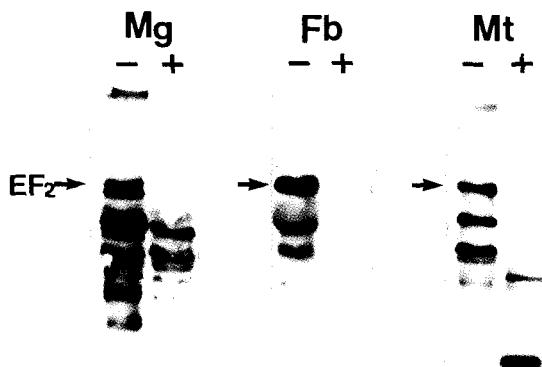


Fig. 3. Comparison of EF2 activity in the midgut(Mg), fat body(Fb), and Malpighian tubule(Mt) between control(−) and Bt toxin ingested larvae(+).

서 공통적으로 조면소포체와 미토콘드리아의 현저한 파괴현상을 보고하였다. 또한 Ebersold 등(1977)은 Bt 독소를 섭식한 *Pieris brassicae*의 중장상 피세포에서 조면소포체가 구형화되어 액포로 축적된다고 하였는데 이러한 조면 소포체의 구형화와 리보솜의 유리등이 단백질합성의 심각한 저해현상을 초래하는 것으로 생각된다.

고농도의 독소가 함유된 배지에서도 지속적으로 합성되는 저장단백질과 45Kd 단백질의 존재는 이미 본 저자들이 Coomassie 염색으로 확인한 바 있으며 열쇼크와 마찬가지로 Bt 독소도 일종의 화학적 스트레스(chemical stress)로 작용하기 때문인 것으로 생각된다(Cheon et al., 1994). Yoo 등(1994)의 보고에 의하면 Bt 독소를 주사한 *Heliothis assulta*에서도 46Kd의 폴리펩티드가 출현하며 이 단백질은 일종의 항균단백질에 속하는데 본 연구의 45Kd 단백질도 유사한 기능을 수행할 것으로 추측된다.

Bt 섭식 유충의 조직에서 단백질 합성능을 확인하기 위한 또 다른 방법으로 단백질 합성의 주요 인자인 번역장인자-2(EF-2)의 활성을 알아보기 위해 Western blot을 실시하였다. 독소를 섭식한 경우 중장, 말피기씨관, 지방체에서 공동적으로 EF-2의 활성이 거의 확인되지 않았다(그림 3). EF-2는 리보솜의 A자리에서 P자리로 새롭게 연장된 peptidyl-tRNA의 전좌(translocation)를 촉매하므로(Maldave, 1985), 단백질 합성기작에 있어서 중요한 조절인자로 작용

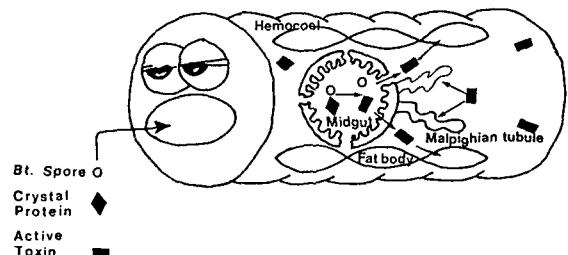


Fig. 4. Diagram showing possibility of Bt toxic effect on the nonmidgut tissues.

한다(Hershey, 1989; Janssen et al., 1990; Maldave, 1985). EF-2의 활성저하는 소포체의 변형과 리보솜의 유리에서 비롯된 것으로 생각된다. 그러나 디프테리아 독소(diphtheria toxin)처럼 직접 전좌의 방해를 유발하는지는 확실치 않으나(Jimenez, 1976), Bt 독소에 의한 2차적 원인제공으로 단백질합성이 저하되는 것으로 생각된다.

Ryerse 등(1990)은 *Heliothis virescens*에서 중장조직 뿐 아니라 말피기씨관의 세포막에 대한 Bt 독소의 결합을 보고하였다. 그러므로 본 연구결과에서 중장이외에 말피기씨관이나 지방체 조직에서 EF-2 활성과 단백질합성 저하는 이들의 세포막에도 독소와 친화성을 가진 수용체의 존재를 시사하고 있다.

Bt 독소에 의해 세포내소기관의 형태변화와 생리적 변화의 유발이 어떻게 야기되는지는 불분명하다. Griego 등(1979)과 Luthy와 Ebersold(1981)는 내독소가 세포막의 능동적 K<sup>+</sup>-수송작용을 저해함으로써 세포수준에서 이온조절이 깨지기 때문인 것으로 보고하고 있다. Bt 독소는 초기 단계에 중상세포막에 존재하는 수용체와 결합하여 미세한 구멍(0.5~1 nm)을 형성하는것으로 생각된다(Knowles 와 Ellar, 1987). 중후단계 0~1 사이의 유충들에 있어서 이미 장내부의 독소분자들이 혈강으로 새어나가거나 혹은 다른조직에 대한 2차적 침투경로를 활성화시킨다고 생각된다. Fast와 Donaghue(1971)은 독소섭식 후 1~3분이내에 혈립프내에서 방사성표지된 독소분자들이 존재함을 확인하였는데 이는 중장의 구멍을 통해 혈립프로 독소가 유출되어 중장이외의 조직에도 독성 효과를 유발할 가능성을 암시한다.

담배나방(Cheon et al., 1994)과 미국흰불나방에서 중후단계 0·1 사이의 유충을 조사한 결과 몇가지 기관들이 이미 표면구조에 병변을 나타내고 있으므로

독소분자들의 2차적인 작용이 시사되고 있다. 이때 시료로 사용한 흰불나방이나 담배나방이 섭식 12시간 후에도 아직 혈립프 pH의 변화를 보이지 않으므로 미세한 구멍을 통한 초기단계의 장액 누출은 혈립프 내의 완충계를 변화시키지 못한다고 생각된다.

Heimpel과 Angus(1959)가 Bt 독소의 감수성에 따라 분류한 곤충 타입에 따르면 흰불나방은 타입 II 곤충에 속한다. 이들의 보고에 의하면 *Bombyx mori*와 같은 곤충은 타입 I에 속하며 독소섭식 초기에 pH의 변화가 급격하고 1~7시간 내에 죽게되나, 타입 II에 속하는 *Malacosoma disstria* 등은 독소섭식 후 수분 내에 섭식은 중단하나 일정한 혈립프 pH를 유지하며 마비증상이 없이 2~4일 정도 경과후 치사한다. 그러므로 본 연구결과에 나타난 여러 조직들의 생화학적 변화는 장액의 유출에 따른 pH변화 때문에 야기된 것이 아님을 시사해준다.

Bt 독소에 의한 중장 이외 조직의 2차적 병변과 이를 유발시키는 독소의 활동경로, 기작 등에 관한 연구가 현재 진행중에 있다.

## 적  요

미국흰불나방(*Hyphantria cunea*)의 유충에서 중장, 지방체, 말피기씨관에 *Bacillus thuringiensis*(Bt) var. *kurstaki*의 내독소 단백질의 독성효과로 인한 생리적 변화를 autoradiography와 Western blot으로 확인하였다.

단백질 합성과 번역연장인자-2에 미치는 영향을 조사한 결과, 앞의 모든 조직에서 단백질 합성이 급격히 저하되었으며, 번역연장인자-2의 활성도 병행하여 저하되었다.

## 사  사

본 연구는 94년도 UR 대응농업기술개발사업 연구비의 지원에 의해 이루어 졌음

## 인용문헌

- Angus, T.A.** (1968) Similarity of effect of valinomycin and *Bacillus thuringiensis* parasporal protein in larvae of *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. **11** : 145-146.  
**Chance, B. and Williams, G.R.** (1955) Respiratory en-

- zymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. J. Biol. Chem. **217** : 383-393.  
**Cheon, H.M., Kang, Y.J., Kang, S.K. and Seo, S.J.** (1994) Scanning electron microscopy of the tissues of *Helicoverpa assulta* larvae intoxicated with *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Korean J. Seric. Sci. **36**(2) : 162-167.  
**Cheon, H.M., Yu, Y.M., Kang, S.K. and Seo, S.J.** (1994) Degradation of the parasporal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* and induction of stress protein synthesis in Bt  $\delta$ -endotoxin ingested larvae of Fall webworm, *Hyphantria cunea*. Korean J. Appl. Entomol. **33**(3) : 178-183.  
**Cooksey, K.E.** (1971) The protein crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*: biochemistry and mode of action. pp. 247-274. In H.D. Burges and N.W. Hussey(ed.) Microbial control of *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Pathol. **9** : 322-330.  
**Ebersold, H. R., Luthy P. and Muller.** (1977) Changes in the fine structure of the gut epithelium of *Pieris brassicae* induced by the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bull. Soc. Entomol. Sci., **50** : 269-276.  
**Ellar, D.J.** (1990) Pathogenicity determinants of entomopathogenic bacteria. In "5th Internation Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control"(Ed. D. Pinnock), pp. 298-302. Society of Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia.  
**Endo, Y. and Nishiutsutsuji-Uwo, J.** (1980) Mode of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol. **35** : 90-103.  
**Fast, P.G. and Donaghue, T.P.** (1971) The  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. II. On the mode of action. J. Invertebr. Pathol. **18** : 135-138.  
**Faust, R.M., Travers, R.S. and Hallam, G.M.** (1974) Preliminary investigations of the molecular mode of action of the  $\delta$ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. J. Invertebr. pathol. **23** : 259-261.  
**Griego, V.M., D. Moffett and K.D. Spence.** (1979) Inhibition of active  $K^+$  transport in the tobacco hornworm(*Manduca sexta*) midgut after ingestion of *Bacillus thuringiensis* endotoxin. J. Insect Physiol. **25** : 283-288.  
**Heimpel, A.M. and Angus, T.A.** (1959) The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. J. Insect Pathol. **1** : 152-170.  
**Hershey, J.B.** (1989) Phosphorylation controls translation rate. J. Biol. Chem. **264** : 2082-2086.  
**Janssen, G.M.C., Massen, J.A. and Moleer, W.** (1990) In ribosome and protein synthesis.(Spedding, G. ed.) pp. 51-68. IRL press, New York.  
**Jimenez, A.** (1976) Inhibitors of translation. Trends Biochem. Sci. **1** : 28-29.  
**Knowles, B.H. and Ellar, D.J.** (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature fo the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxins with differnt

- insect specificity. *Biochem. Biophys. Acta.* **924** : 509-518.
- Laemmli, U.K.** (1971) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227** : 680-685.
- Lello, E., Hanton W.K., Bishoff, S.T. and Misch, O.W.** (1984) Histopathological effects of *Bacillus thuringiensis* on the midgut tobacco hornworm larvae (*Manduca sexta*): Low doses compared with fasting. *J. Invertebr. Pathol.* **43** : 169-181.
- Luthy, p. and Ebersold, H.r.** (1981) *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathology and molecular mode of action. In *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*(ed. E.W. Davidson). Allenheld, Osmun and Co. Publ., Totowa, NJ, USA, 235-267.
- Maldave, K.** (1985) Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **54** : 1109-1149.
- Perey, J. and Fast, P.G.** (1983) *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* **41** : 86-98.
- Ryerse, J.S., Beck, J.R. and Lavrik, P.B.** (1990) Light microscope immunolocation of *Bacillus thuringiensis kurstaki*  $\delta$ -endotoxin in the midgut and Malpighian tubules of the tobacco budworm, *heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* **56** : 86-90.
- Wolfersberger, M.G.** (1990) Specificity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to lepidopteran larvae: recent insights from studies using brush border membrane vesicles. In "5th International Colloquium of Invertebrate Pathology and Microbial Control"(Ed. D. Pinnock), pp. 278-282. Society for Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia.
- Yoo, C.M., Jeong, S.E. and Lee, H.C.** (1994) Purification of antivacterial proteins in *Heliothis assulta* injected with *Bacillus thuringiensis*. *Korean J. Zool.* **2** : 274-280.
- Yunovitz, H. and Yawetz, A.** (1988) Interaction between the  $\delta$ -endotoxin product by *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* and liposomes. *FEBS Lett.* **230** : 105-108.